

杆菌霉素 L 合成途径负调控子 AbrB 和 ResD 的分子机制及其高产菌株的构建

王小花¹, 沈瀚文¹, 蔡莎丽¹, 刘雯倩¹, 刘雪辉², 周长勇³, 尹秀莲¹, 苏可鑫¹, 罗楚平^{1*}

1 淮阴工学院, 益生制剂重点建设实验室, 江苏 淮安

2 中国科学院生物物理研究所, 北京

3 淮安市农科院, 江苏 淮安

王小花, 沈瀚文, 蔡莎丽, 刘雯倩, 刘雪辉, 周长勇, 尹秀莲, 苏可鑫, 罗楚平. 杆菌霉素 L 合成途径负调控子 AbrB 和 ResD 的分子机制及其高产菌株的构建[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3309-3323.

WANG Xiaohua, SHEN Hanwen, CAI Shali, LIU Wenqian, LIU Xuehui, ZHOU Changyong, YIN Xiulian, SU Kexin, LUO Chuping. Molecular mechanisms of AbrB and ResD as negative regulators in the bacillomycin L biosynthetic pathway and construction of high-yield strains[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(7): 3309-3323.

摘要: 【目的】贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) Bs916 产生的杆菌霉素 L 是一种环脂肽类抗生素, 已被证实具有较强的抗真菌活性。然而, 低产量问题已成为制约其大规模应用的重要瓶颈。本研究旨在鉴定杆菌霉素 L 生物合成的负转录调控因子, 并在此基础上采用基因工程技术与发酵工艺优化双重策略以推动其实现规模化生产。【方法】利用同源重组技术构建了 $\Delta resD$ 、 $\Delta abrB$ 单敲除突变株及 $\Delta resD\Delta abrB$ 双敲除突变株, 通过 HPLC、抑菌圈及 RT-qPCR 实验阐明其调控特性; 利用电泳迁移率转移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)与 DNase I 足迹实验(DNase I footprinting assay)检测转录因子与杆菌霉素 L 合成基因簇(*Bac*)转录起始位点侧翼序列的结合活性及具体结合位点; 利用发酵罐进行发酵工艺优化以进一步提升杆菌霉素 L 的产量。【结果】HPLC 结果显示, 各突变株在 LB 培养基中杆菌霉素 L 的产量均大幅提升, 分别较野生型菌株提高 5.8、11.3、12.0 倍, 其对植物病原真菌的拮抗活性也呈现出一致的增强趋势。RT-qPCR 结果进一步证实, ResD 与 AbrB 均为杆菌霉素 L 生物合成的负调控因子。EMSA 实验结果表明, ResD 和 AbrB 均与靶标序列表现出较强的结合活性。DNase I 足迹实验进一步揭示, AbrB 倾向于结合富含 A+T 的基因片段, 并展现出广泛的 DNA 结合能力, 可直接作用于 *Bac* 基因簇的启动子区、5'非翻译区(5' UTR)及编码区。遗憾的是, ResD 的具体结合位点尚未明确。在发酵罐条件

资助项目: 国家自然科学基金(32372619); 江苏省农业科技自主创新资金[CX(24)3067]

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32372619) and the Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund [CX(24)3067].

*Corresponding author. E-mail: luochuping@163.com

Received: 2026-01-16; Accepted: 2026-02-07; Published online: 2026-03-03

下, 基因工程菌株 $\Delta resD\Delta abrB$ 在优化的葡萄糖-无机盐培养基中杆菌霉素 L 每升产量能达到克级别, 这一结果极大地推动了杆菌霉素 L 的规模化生产。【结论】通过基因工程菌株构建与发酵工艺优化相结合双重策略, 可有效突破芽孢杆菌源抗菌肽低产量的应用瓶颈, 这也为其他微生物次级代谢产物的量产实践提供了重要借鉴。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 杆菌霉素 L; AbrB; ResD; 高产基因工程菌株

Molecular mechanisms of AbrB and ResD as negative regulators in the bacillomycin L biosynthetic pathway and construction of high-yield strains

WANG Xiaohua¹, SHEN Hanwen¹, CAI Shali¹, LIU Wenqian¹, LIU Xuehui², ZHOU Changyong³, YIN Xiulian¹, SU Kexin¹, LUO Chuping^{1*}

1 Key Laboratory of Probiotic Preparations, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an, Jiangsu, China

2 Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

3 Huai'an Academy of Agricultural Sciences, Huai'an, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] Bacillomycin L, a cyclic lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus velezensis* Bs916, has been demonstrated to possess strong antifungal activity. However, its low yield has become a critical bottleneck limiting its large-scale application. This study aims to identify the negative transcriptional regulators involved in bacillomycin L biosynthesis and, based on this, adopt a dual strategy combining genetic engineering and fermentation process optimization to promote its large-scale production. [Methods] Homologous recombination was employed to construct single ($\Delta resD$, $\Delta abrB$) and double ($\Delta resD\Delta abrB$) knockout strains. The regulatory characteristics were elucidated by HPLC, inhibition zone measurement, and RT-qPCR. Furthermore, EMSA and DNase I footprinting assays were conducted to investigate the binding activity and identify the specific binding sites of these transcription factors with the flanking sequences of the transcription initiation site of the *Bac* gene cluster. Finally, fermentation process optimization was performed in a bioreactor to further enhance the production of bacillomycin L. [Results] HPLC results demonstrated that the bacillomycin L yields of all the mutant strains cultured in the LB media significantly increased by 5.8, 11.3, and 12.0 folds compared with that of the wild-type strain. The antagonistic activities of the mutants against plant pathogenic fungi exhibited corresponding increases. RT-qPCR results further confirmed that both ResD and AbrB acted as negative regulators of bacillomycin L biosynthesis. EMSA experiments revealed that both ResD and AbrB possessed strong binding activities with their target sequences. DNase I footprinting assays further elucidated that AbrB exhibited a propensity for binding to A+T-rich gene fragments and displayed extensive DNA-binding capabilities, directly interacting with the promoter region, 5' UTR, and coding regions of the *Bac* gene cluster. Unfortunately, the specific

binding site of ResD remained to be identified. Under fermentation conditions, the genetically engineered strain $\Delta resD\Delta abrB$ achieved gram-per-liter level production of bacillomycin L in an optimized glucose-mineral salts medium. This result greatly promoted the large-scale production of bacillomycin L. **[Conclusion]** Adopting a dual strategy that combines genetic engineering with fermentation process optimization effectively breaks the bottleneck of low yields for *Bacillus*-derived antimicrobial peptides. This study provides a reference for the mass production of other microbial secondary metabolites.

Keywords: *Bacillus velezensis*; bacillomycin L; AbrB; ResD; high-yield genetically engineered strain

芽孢杆菌源脂肽是一类两亲性抗生素, 由亲水性的线性、环化或部分环化短肽与疏水性脂肪酸链结合而成^[1-3]。此类物质通常通过非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPSs)或聚酮合酶-非核糖体肽合成酶(polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase, PKS-NRPSs)途径合成, 其独特的模块化组装模式赋予了脂肽头部结构和生物活性高度多样性^[4]。此外, 尾部 β -羟基或 β -氨基脂肪酸链在长度、异构形式及饱和度方面的差异可进一步增强其结构多样性^[3]。脂肽类物质丰富的结构差异赋予了其功能的多样性, 进而影响其在农业、医药、食品等领域的潜在应用。杆菌霉素 L 属于伊枯草素(iturin)家族, 是目前研究最为广泛的芽孢杆菌源环脂肽之一, 其结构中含有一个由 7 个氨基酸残基组成的肽链(L-Asp-D-Tyr-D-Asn-L-Ser-L-Gln-D-Ser-L-Thr)和一条含 14–17 个碳原子的 β -氨基脂肪酸链^[5]。杆菌霉素 L 对多种酵母菌和植物病原真菌表现出强效的抗真菌活性^[5], 但抗细菌和抗病毒活性有限^[6-7]。尽管杆菌霉素 L 有望成为农业上替代性抗真菌剂, 但发酵产量低及体外合成困难等问题已成为限制其实现工业化生产的主要障碍^[8-9]。

已有研究表明, 脂肽类抗生素的合成受到 AbrB、ResD 等多个转录因子的紧密调控^[10-12]。AbrB 是一种由 94 个相同残基单体组成的四聚体, 每个单体包含 2 个独立结构域: N 端 DNA 结合结构域(AbrBN)和 C 端多聚化结构域

(AbrBC)^[13]。其 DNA 结合功能完全由 N 端结构域 AbrBN 实现, 该结构域由 53 个残基组成, 采用翼状螺旋-转角-螺旋折叠方式。与识别特定 DNA 碱基配对序列不同, AbrB 在 DNA 结合方面具有一定的非特异性^[13-14]。作为一种过渡性全局调控因子, AbrB 在细菌对数生长期或过渡期直接调控超过 100 个与抗生素合成、细胞分裂、芽孢形成等相关基因的转录^[15-16]。已有研究证实, AbrB 可作为双向调控因子正向调控杀虫蛋白 Sip1Ab1 的分泌^[17], 同时负向调控芽孢杆菌中表面活性素、伊枯草菌素、罗克霉素等脂肽类抗生素的产生^[18-21]。ResD 是 ResD-ResE (响应调节因子-传感器激酶)双组分信号转导系统的核心组分, 在原核微生物有氧和无氧呼吸过程中发挥重要的全局调控作用^[22]。ResD 属于 OmpR 亚家族, 包含 C 端效应结构域和 N 端接收结构域 2 个部分。其中, C 端效应结构域属于翼状螺旋-转角-螺旋家族转录调控因子, 含有 DNA 和 RNA 聚合酶的结合位点; N 端接收结构域自身不直接结合 DNA, 而是通过接收磷酸基团激活 C 端效应结构域, 进而调控相关基因的表达^[23-24]。在高钙胁迫条件下, ResD 与 ResE 协同作用, 间接调控芽孢杆菌中泛革素合成操纵子(*fen*)和表面活性素合成操纵子(*srfA*)的表达^[12,25]。前期研究也证实, ResD 能够通过直接结合罗克霉素(locillomycin)合成基因簇(*loc*)的启动子区域负调控罗克霉素的合成^[21], 但其对杆菌霉素 L 的调控作用尚未见报道。

目前,除遗传工程改造手段外,培养基优化、补料分批培养及产物连续分离等策略也是提高芽孢杆菌源脂肽(如表面活性素、泛革素等)产量的重要手段^[8,26]。本研究旨在挖掘并鉴定与杆菌霉素 L 生物合成相关的负转录调控因子,阐明其调控机制,并通过分子生物学技术构建高产工程菌株;在此基础上,进一步开展规模化发酵工艺优化,通过双重策略的叠加应用,以期突破杆菌霉素 L 低产量的应用瓶颈,实现芽孢杆菌源抗菌肽的规模化生产。

1 材料与方法

1.1 菌株和抗生素

生防菌贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) Bs916 及其突变株由本实验室保存;大肠埃希氏

菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 BL21 购自北京全式金生物技术有限公司;链格孢菌(*Alternaria alternata*) S-3 由淮安市农业科学院生物防治研究室分离保存。培养基中的抗生素按需添加,工作浓度分别为:氨苄青霉素 100 $\mu\text{g/mL}$,卡那霉素 50 $\mu\text{g/mL}$,红霉素 1 $\mu\text{g/mL}$,氯霉素 5 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2 贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 突变菌株的构建

以 Bs916 基因组为模板,参考文献[21]所述方法进行 PCR 扩增,获得包含 *abrB* 和 *resD* 部分序列的基因片段,所用引物详见表 1。以实验室保存的 pMUTINLoc 和 pSGFen^[27] 为骨架载体,分别用 *Hind* III/*Bam*HI 和 *Xho* I/*Eco*RI 进行双酶切处理,随后插入经相同双酶切处理的 PCR 扩增基因片段,替换其中的 *Loc* 和 *Fen* 基

表1 本研究中所用引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Size/bp	Sequences (5'→3')	Function
AbrB-F	29	TTTAAGCTTTTCGACATTCTGAATGGGAG (<i>Hind</i> III)	Amplify the 670 bp segment of the <i>abrB</i> sequence and construct the gene knockout vector pMUTINAbrB
AbrB-R	29	TTTGATCCATCATCAGAACTTCACCAG (<i>Bam</i> HI)	
ResD-F	29	TTTCTCGAGAATCTGATGCCAGCCCCATT (<i>Xho</i> I)	Amplify the 842 bp segment of the <i>resD</i> sequence and construct the gene knockout vector pSGResD
ResD-R	29	TTTGAATTCAGCATCGCGATCATTACAGGA (<i>Eco</i> RI)	
pET-AbrB-F	28	TTTCCATGGTGAAATCTACTGGTATCGT (<i>Nco</i> I)	Expand the complete <i>abrB</i> sequence and construct the transcription factor expression Vector pET-AbrB
pET-AbrB-R	29	TTTCTCGAGTTTTTGGTTTTGAAGCTGGT (<i>Xho</i> I)	
pET-ResD-F	29	TTTCCATGGTGGATCAAACAAATGAACT (<i>Nco</i> I)	Expand the complete <i>resD</i> sequence and construct the transcription factor expression Vector pET-ResD
pET-ResD-R	27	TTTCTCGAGTTCAGCGCTACCTCAA (<i>Xho</i> I)	
Primer1-F (FAM)	19	TTCTTATACTTTTTAAAAAACAGCCGC	Amplify the 503 bp probe fragment for use in EMSA and DNase I footprinting experiments
Primer1-R	18	ATCTAACATCCTAGCATG	
Primer2-F (FAM)	18	TCCTAAGTGAAGAAGAGCC	Amplify the 651 bp probe fragment for use in EMSA and DNase I footprinting experiments
Primer2-R	19	CACGGCGGCCATCGTCCC	
Primer3-F (FAM)	16	CATTCTGTTGTCTCAG	A probe sequence of 546 base pairs is used for amplification, serving as a non-target negative control for the EMSA experiment RT-qPCR experiment
Primer3-R	16	TCAAATTGTCTCATAC	
16S rDNA-F	24	TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC	
16S rDNA-R	24	TCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCG	
<i>Bac</i> D-F	24	CTGTGTTTTAACGGAGATATGAAT	
<i>Bac</i> D-R	24	GCCGGCACAGACAAGCGCTGAATA	

因片段, 最终获得重组敲除载体 pMUTINabrB 和 pSGResD。将重组载体转化至 Bs916 感受态细胞中, 分别在含氯霉素和红霉素的 LB 平板上筛选, 获得突变株 $\Delta resD$ 和 $\Delta abrB$ 。将重组载体 pSGResD 转化至 $\Delta abrB$ 感受态细胞中, 在同时含氯霉素和红霉素的 LB 平板上筛选获得双突变株 $\Delta resD\Delta abrB$ 。

1.3 贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 突变菌株杆菌霉素 L 产量分析

将 Bs916 及其突变株分别接种于 LB 培养基中, 37 °C 培养 48 h 后, 将菌液以 8 000 r/min 离心 10 min, 收集发酵上清液, 调节 pH 至 2.8, 4 °C 静置过夜。经二次离心收集的沉淀用甲醇提取。为进一步纯化杆菌霉素 L, 采用安捷伦氨基固相萃取柱及 C18 固相萃取柱对甲醇提取物依次进行纯化, 梯度洗脱步骤参照文献[5]的方法操作。使用安捷伦 1100 系列高效液相色谱-质谱联用系统(HPLC-MS/MS)对洗脱液进行检测, 检测波长为 210 nm, 流动相为乙腈-水-三氟乙酸体系(体积比 60:40:0.5), 流速为 0.5 mL/min。培养基优化及培养方案参照文献[28]的方法进行。发酵培养参数通过碳源(蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、可溶性淀粉)、氮源(胰蛋白胨、酵母粉、牛肉膏、硝酸铵)、金属离子(Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+})及接种量(2%、4%、6%、8%、10%)的摇瓶发酵实验及响应面, 结合 Box-Behnken 模型进行优化, 最终确定优化培养基组成(g/L): 葡萄糖 10.0, 谷氨酸 5.0, 硝酸铵 4.0, 大豆油 2.0, 磷酸二氢钾 4.08, 磷酸氢二钠 5.68, 柠檬酸钠 0.002 06, 氯化钙 0.000 777, 七水硫酸镁 0.001 23, 七水硫酸亚铁 0.001 11, 五水硫酸锰 0.000 241; 接种量为 4.7%。培养方案: 利用 5 L 发酵罐, 工作体积 2.0 L, 温度 30 °C, 搅拌转速 180 r/min, 通气量 0.5 vol/(vol·min), 培养 15 h 制备种子液。发酵实验在 50 L 发酵罐中进行, 排气管路加装泡沫收集装置以捕获溢出泡沫。工作体积为 30 L, 接种 1.5 L 种子液, 通气量为 1 vol/(vol·min),

其余培养参数与 5 L 发酵罐一致。发酵过程中, 采用二硝基水杨酸与还原性在碱性条件下发生氧化还原反应(DNS 法)测定发酵液中还原糖含量, 并补加葡萄糖母液(50% 葡萄糖溶液, 115 °C, 15 min)以维持碳源浓度稳定在 10 g/L 左右。所有发酵实验均设 3 次重复。

1.4 贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 及其突变菌株抗真菌活性测定

将 Bs916 及其突变株 $\Delta resD$ 、 $\Delta abrB$ 、 $\Delta resD\Delta abrB$ 分别接种于不含抗生素的 LB 培养基中, 37 °C 培养 48 h。培养结束后, 将菌液以 8 000 r/min 离心 10 min, 上清液经 0.22 μm 滤膜过滤, 获得待测样品。将指示菌链格孢菌 S-3 接种于 PDA 培养基, 28 °C 培养 48 h, 用打孔器将菌饼接种于 LB 与 PDA 混合培养基平板中央。以菌饼为中心, 对称打 4 个孔, 每孔加入 200 μL 滤液至牛津杯内, 28 °C 孵育 48 h, 通过测定抑菌圈面积评估 Bs916 及其突变株的抗真菌活性。抑菌圈面积计算如公式(1)所示。

$$S=\pi(D/2)^2 \quad (1)$$

式中: S 为抑菌圈面积(mm^2), D 为抑菌圈平均直径(mm)。

1.5 *Bac* 基因簇在贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 及其突变株中的表达水平分析

采用 RT-qPCR 测定贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 及其突变株 $\Delta resD$ 、 $\Delta abrB$ 、 $\Delta resD\Delta abrB$ 中 *Bac* 基因簇的 mRNA 表达水平。所有菌株均接种于 LB 培养基中, 37 °C 培养 12、24、48、72、96 h。使用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)提取总 RNA, 并利用 Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR 试剂盒(Qiagen 公司)进行逆转录与 qPCR 扩增。以 16S rRNA 基因为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法[29]计算目的基因的相对表达水平。所有实验均设 3 次重复, 相关引物信息详见表 1。

1.6 重组转录因子蛋白的制备与纯化

以 Bs916 基因组为模板, 参考文献[21]所述方法进行 PCR 扩增, 获得完整的 *abrB* 和 *resD*

基因片段,所用引物详见表1。以 pET-28a 为骨架载体,按照 DNA 克隆及感受态细胞(*E. coli* DH5 α)转化的标准方法,成功构建表达载体 pET-AbrB 和 pET-ResD。随后,将重组质粒及空载体 pET-28a 分别转化至 *E. coli* BL21(DE3)细胞中,并在含卡那霉素的 LB 琼脂平板上筛选转化子。当重组菌株在 LB 培养基中生长至对数中期时,向摇瓶中加入 IPTG (终浓度 0.8 mmol/L),16 °C 诱导培养 12 h。将离心收集的细胞沉淀重悬于细胞裂解液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4; 200 mmol/L NaCl; 2 mmol/L MgCl₂; 2–3 mmol/L 咪唑)中,利用低温超声波破碎仪处理至溶液澄清透明,并通过 SDS-PAGE 对上清液进行检测。为进一步获得纯化的重组转录因子蛋白,按照 Ni-NTA 6FF Sefinose^T 树脂试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]的操作说明进行纯化。最后,使用透析袋(Solarbio 公司)去除咪唑等小分子杂质,获得满足电泳迁移率转移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)和 DNase I 足迹实验要求的蛋白样品。

1.7 电泳迁移率转移实验(EMSA)

以 Bs916 基因组为模板,使用 2 $\times$ TOLO HIFI DNA Polymerase Premium (TOLO Biotech 公司)和羧基荧光素(5-carboxyfluorescein, FAM)标记引物制备 DNA 探针。非靶标阴性对照采用 Bs916 基因组中一段与实验靶标无同源性的 DNA 片段,以排除非特异性结合造成的实验干扰。探针扩增所用引物见表1。随后,将 50 ng DNA 探针与不同浓度(0.0、0.5、2.0、5.0 μ g)的转录因子蛋白在反应缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、100 mmol/L KCl、2.5 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L DTT、2 μ g salmon sperm DNA 和 10% 甘油]中混合,25 °C 孵育 30 min。将 DNA-蛋白结合产物上样至 6% TBE 凝胶,以 150 V 进行电泳分离。最后,使用 ImageQuant LAS 4000 mini 成像系统对凝胶进行成像。

1.8 DNase I 足迹实验

DNase I 足迹实验参照文献[21,30]的方法进行,简要步骤如下:将 50 ng DNA 探针与 5 μ g 蛋白在与 1.7 节 EMSA 实验相同的反应条件下孵育。随后,向 DNA-蛋白结合产物中加入 0.015 U DNase I (Promega 公司),37 °C 孵育 1 min。对上述反应产物采用酚-氯仿法抽提以去除蛋白质成分,再通过乙醇沉淀回收 DNA。将 DNA 沉淀重悬于超纯水中,使用 ABI 测序仪及 ABI GeneScan 500 Liz DNA 分子量内标进行分析。

1.9 数据处理

数据采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析,并利用 Origin 2018 软件绘制柱状图。以 $P < 0.05$ 为显著性水平,采用 Duncan's 多重比较检验进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 及其突变株中杆菌霉素 L 产量分析

为鉴定转录因子 AbrB 与 ResD 对目标基因簇 *Bac* 的调控特征,利用同源重组技术构建了贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 单突变株 $\Delta resD$ 、 $\Delta abrB$ 及双突变株 $\Delta resD \Delta abrB$ 。HPLC-MS 测定结果显示,Bs916 能够产生杆菌霉素 LA 和杆菌霉素 LB 2 种同系物,二者加氢后的质荷比(m/z)分别为 1 021.6 和 1 035.6 (图 1)。Bs916 及其突变株在 LB 培养基中培养 12 h 后均能高效合成杆菌霉素 L,这与我们此前的研究结果杆菌霉素 L 的生物合成仅发生在对数生长后期或静止生长期一致(图 1A、表 2)^[5,27]。进一步分析发现,与野生型菌株相比,敲除 *resD* 和 *abrB* 基因可使杆菌霉素 L 产量分别提高 5.8 倍和 11.3 倍;双基因同时失活时,杆菌霉素 L 产量可提升至野生型的 12.0 倍,达到 235.1 mg/L (图 1A、表 2)。上述结果表明,转录因子 ResD 与 AbrB 对环脂肽类抗生素杆菌霉素 L 的合成均起负调控作用。

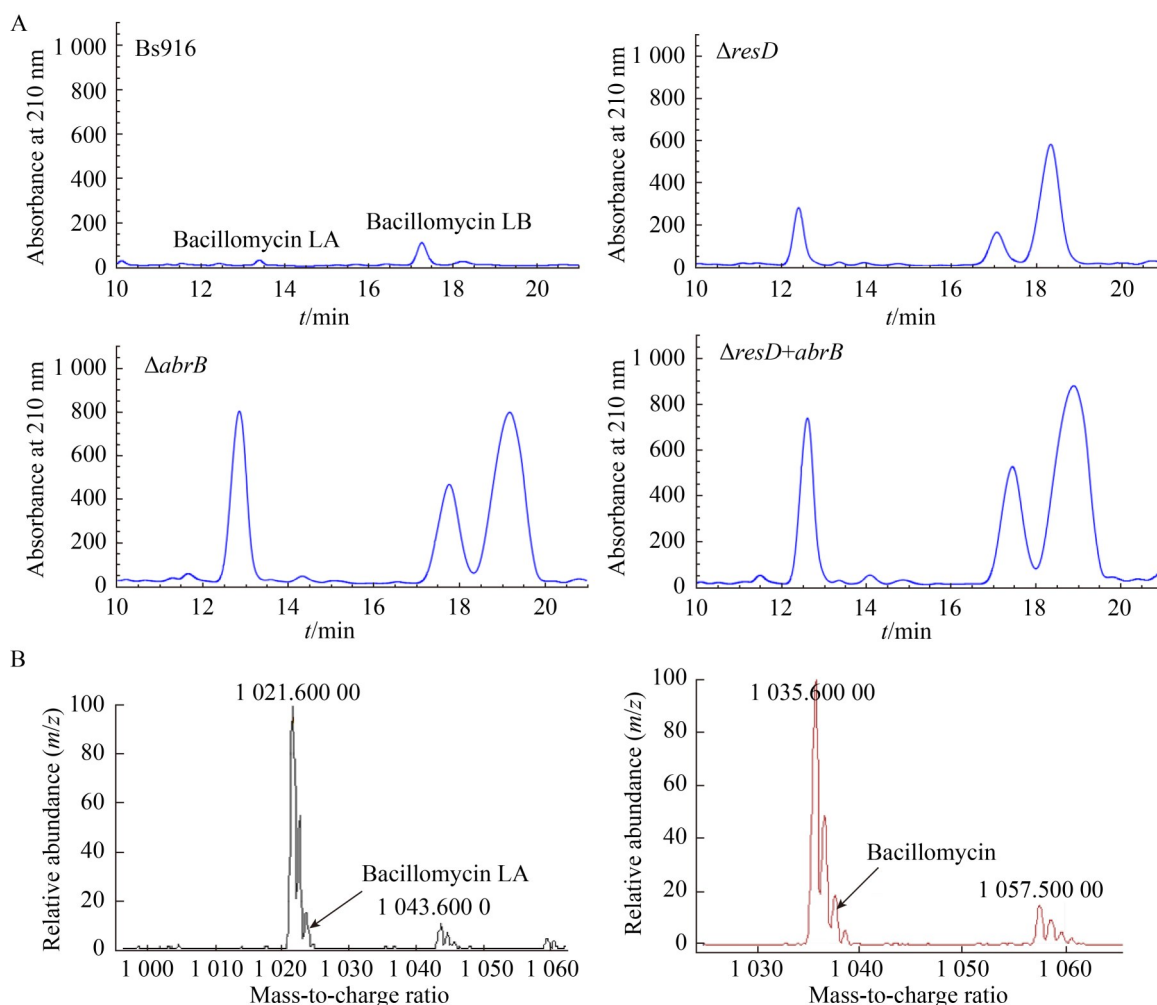


图1 贝莱斯芽孢杆菌Bs916及其突变株在LB培养基中杆菌霉素L产量分析

Figure 1 Analysis of bacillomycin L production by *Bacillus velezensis* Bs916 and its mutant strains in LB medium. A: High-performance liquid chromatography (HPLC) chromatogram; B: Mass spectrometry (MS) analysis spectrum of bacillomycin L.

2.2 贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 及其突变株抗菌活性分析

为更直观地比较贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 及其突变株的抑菌活性差异, 采用牛津杯法测定抑菌圈直径。结果显示, 敲除 *resD* 或 *abrB* 基因均可显著增强 Bs916 菌株对链格孢菌 S-3 的抑菌活性, 而双基因同时敲除时抑菌活性进一步提高(图 2)。上述结果表明, ResD 与 AbrB 蛋白的失活可促进贝莱斯芽孢杆菌中杆菌霉素 L 等抗真菌活性物质的合成, 这一结论与 HPLC-MS 定

量结果相互印证。

2.3 贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 及其突变株中 *Bac* 基因簇的转录分析

为进一步验证 AbrB 与 ResD 对杆菌霉素 L 合成的负调控作用, 本研究检测了 Bs916 及其突变株中 *BacD* 基因的转录水平。*BacD* 是杆菌霉素 L 合成基因簇(*Bac*)中的起始模块基因, 编码非核糖体肽合成酶, 负责 β -氨基脂肪酸与首个氨基酸的偶联, 启动脂肽链组装, 是整个合成途径的关键起始因子。RT-qPCR 结果(图 3)显

表2 贝莱斯芽孢杆菌Bs916及其突变株在LB及优化培养基中杆菌霉素L产量检测

Table 2 Bacillomycin L production by *Bacillus velezensis* Bs916 and its mutants grown in LB or optimized medium

Strains	LB medium						Optimized medium	
	Biomass/		Bacillomycin L/(mg/L)				Biomass/	
	(g/L)		48 h	12 h	24 h	48 h	(g/L)	Bacillomycin L/
							(g/L)	(mg/L)
			48 h	12 h	24 h	48 h	48 h	48 h
Bs916	3.86±0.32	0	15.9±0.3q	19.6±0.4p	16.3±0.4q	15.5±0.3q	4.88±0.32	56.8±0.3n
ΔresD	3.71±0.34	0	47.7±0.3o	114.1±0.4i	108.1±0.3k	100.2±0.5l	4.66±0.34	363.2±0.3c
ΔabrB	3.72±0.41	0	63.6±0.3m	222.3±0.4e	205.5±0.5g	198.5±0.6h	4.65±0.41	821.5±0.4b
ΔresDΔabrB	3.73±0.39	0	111.3±0.5j	235.1±0.5d	224.2±0.6e	214.8±0.3f	4.64±0.39	1 175.5±0.4a

The lowercase letters a–q in the figure all represent significant difference markers.

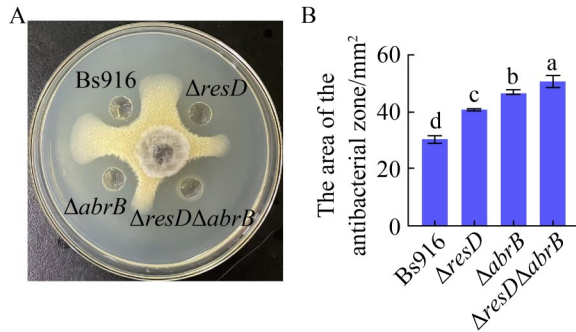


图2 贝莱斯芽孢杆菌Bs916及其突变株对链格孢菌S-3的抑菌活性分析

Figure 2 Analysis of the antimicrobial activity of *Bacillus velezensis* Bs916 and its mutants against *Alternaria alternata* S-3. A: Antifungal effects of Bs916 and its mutants against *Alternaria alternata* S-3; B: Inhibition zone diameters of Bs916 and its mutants against *Alternaria alternata* S-3. Different lowercase letters (a–d) indicate significant differences ($P<0.05$).

示，随着发酵时间延长，Bs916 中 *BacD* 基因的表达量逐渐升高，并在 48 h 达到峰值。突变株 $\Delta resD$ 、 $\Delta abrB$ 及 $\Delta resD\Delta abrB$ 中 *BacD* 基因的表达趋势与之相似，但在整个发酵过程中均显著高于野生型。其中，双突变株 $\Delta resD\Delta abrB$ 在 48 h 时的转录水平上调最为显著，约为野生型的 9.8 倍，分别为 $\Delta resD$ 的 5.2 倍和 $\Delta abrB$ 的

2.4 倍，这一结果与 HPLC-MS 定量结果一致。基于此，我们推测 *AbrB* 和 *ResD* 作为转录调控因子，可能通过与 *Bac* 基因簇上游启动子、5' 非翻译区(5' untranslated regions, 5' UTR)或编码区序列结合而抑制其转录表达，从而下调杆菌霉素 L 的合成。

2.4 转录因子蛋白的异源表达纯化及其与 *Bac* 基因簇转录起始位点侧翼 DNA 序列结合位点的鉴定

为进一步验证上述推测，本研究以 pET-28a 为表达载体，以 *Escherichia coli* BL21(DE3)为表达宿主，对 *resD* 和 *abrB* 转录因子基因进行异源

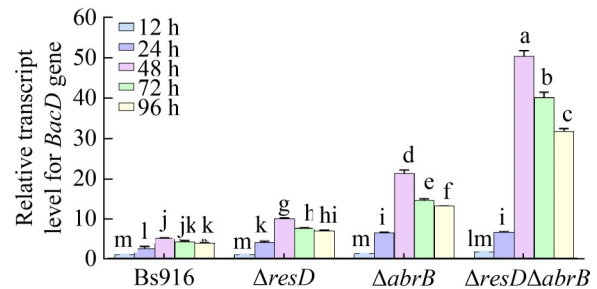


图3 *Bac*基因簇中*BacD*基因在贝莱斯芽孢杆菌Bs916及其突变株中的表达水平分析

Figure 3 Analysis of *BacD* gene the expression level in the *Bac* gene cluster of *Bacillus velezensis* Bs916 and its mutants. Different lowercase letters (a–m) indicate significant differences ($P<0.05$).

表达。结果显示, ResD (27.45 kDa)与 AbrB (10.51 kDa)蛋白均成功表达(图 4A), 且二者均为水溶性蛋白; 经 Ni 柱亲和纯化后获得了条带单一、纯度较高的目标蛋白(图 4B)。

为明确 ResD 与 AbrB 是否可直接结合 *Bac* 基因簇转录起始位点侧翼的 DNA 序列, 本研究通过 EMSA 实验检测了二者与靶 DNA 序列的结合活性。其中, Probe3 作为阴性对照, 来源于 Bs916 基因组中一段非靶标 DNA 片段; Probe1 覆盖了杆菌霉素 L 编码基因簇起始模块 BacD 上游的启动子区域; Probe2 覆盖了 BacD 上游的部分启动子区域、5' 非翻译区(5' UTR)和部分编码区。如图 4C 所示, Lane a 为对照组, 即仅加入

探针而未添加转录因子蛋白; Lanes b–d 的蛋白添加量分别为 0.5、2.0、5.0 μg 。当向结合体系中加入 AbrB 并与 Probe1 或 Probe2 共孵育时可观察到条带迁移速率显著减慢(图 4C 中 1、2), 且呈现一定的 AbrB 剂量依赖性, 即随着蛋白添加量增加, 探针-蛋白复合物的阻滞效应愈加明显。在低蛋白浓度(0.5 μg)下, 与 Probe1 相比, Probe2 对应泳道已出现明显阻滞, 提示其与 AbrB 蛋白可能具有更强的结合活性(图 4C 中 1、2)。ResD 与 Probe1 和 Probe2 的结合实验也观察到类似的阻滞现象, 但 Probe1 表现出比 Probe2 更强的结合活性(图 4C 中 4、5)。作为阴性对照的 Probe3 在所有泳道均未出现阻滞现象,

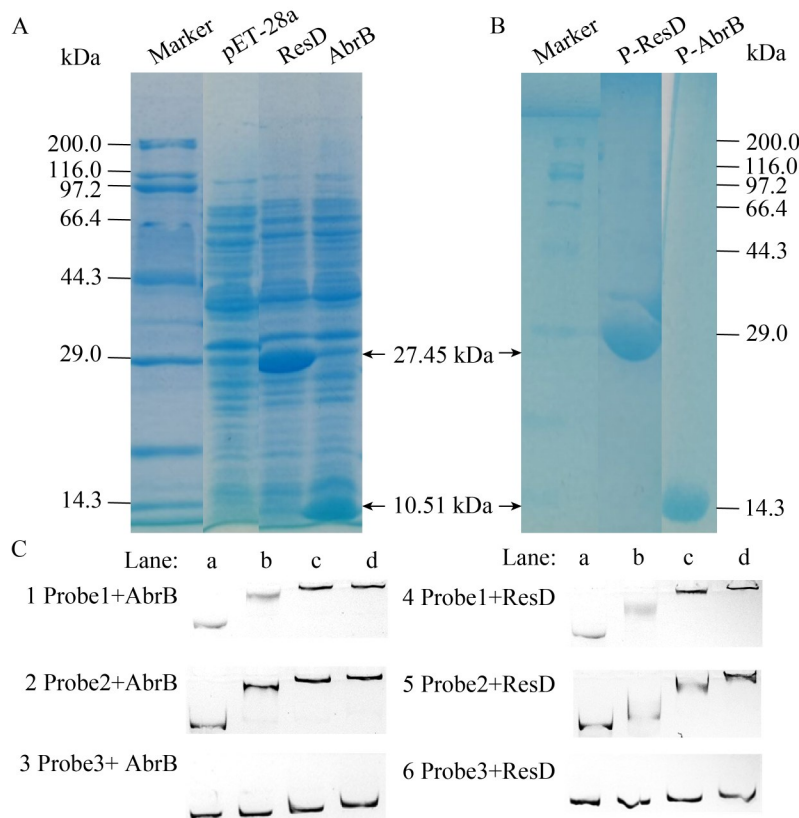


图4 ResD和AbrB蛋白的表达纯化及其与*Bac*基因簇侧翼序列结合活性分析

Figure 4 Expression and purification of ResD and AbrB proteins and analysis of their binding activity to the flanking sequences of the *Bac* gene cluster. A: Whole-cell ultrasonic lysis analysis of heterologously expressed transcription factor proteins from *Bacillus velezensis* Bs916; B: Purification of heterologously expressed transcription factor proteins; C: Detection of the binding activity of Probe 1 and Probe 3 to ResD or AbrB.

即使蛋白添加量达到 5 μg (图 4C 3、6)。上述结果表明, ResD 和 AbrB 蛋白可能通过直接结合 *Bac* 基因簇转录起始位点上游和/或下游序列来调控杆菌霉素 L 的转录水平。

为进一步鉴定 ResD 和 AbrB 在 *Bac* 基因簇上游侧翼序列中的特异性 DNA 结合位点, 本研究利用纯化的重组 ResD 和 AbrB 蛋白进行了 DNase I 足迹分析。结果显示(图 5A), 当加入 Probe1 和 AbrB 时, 在相对于转录起始位点 -292--206 bp 的区域(图 6A)内检测到一段 86 bp 的结合序列(CAGTTTACAATCCTTCACAGATATACAAATGATTTTTTACAATAAACAGAAAATATGTAATTTCTGACACAATAATGCCAATAGCC)。类似地, Probe2 鉴定出 3 段与 AbrB 结合的序列(图 5B), 分别位于 -16--45 bp、+80--102 bp 和 +112--154 bp 区域(图 6A), 长度分别为 61 bp (TTGTTATAATCATGCTAGGATGTTAGATAAAGGGATATTTTGTAGGATATTGTATCCCCTG)、23 bp (TGCCTTTTTATTTCTGGACAAG) 和 43 bp (TTGTAGGAATGGGCAAACAATTTTGGAATGATTGTGCTCGC)。进一步分析发现上述四段序列中 A+T 的含量分别为 72.09%、67.21%、60.87% 和 60.47%。上述结果表明, AbrB 具有广泛的 DNA 结合特性, 可通过结合上游侧翼序列中启动子、5' 非翻译区(5' UTR)和/或编码区的多个位点来调控下游 *Bac* 基因簇的表达水平(图 6B), 且其倾向于结合靶序列中富含 A+T 的区域。然而, 尽管 ResD 与 Probe1 和 Probe2 均表现出良好的结合活性, 但经多次尝试仍未能成功鉴定其特异性结合位点(图 5C、5D)。

2.5 优化培养基组成与发酵条件以提高杆菌霉素 L 产量

为进一步挖掘贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 基因工程衍生菌株在杆菌霉素 L 规模化生产中的潜力, 本研究采用了培养基优化、补料分批培养及产物连续分离等策略。结果显示, 以葡萄糖为碳源、硝酸铵为氮源, 并添加适量 Fe^{2+} , 有

助于贝莱斯芽孢杆菌生产脂肽类抗生素(如表面活性素等, 数据未展示)。杆菌霉素 L 在优化培养基及发酵条件下的产量较原始 LB 分批发酵显著提升(表 2), Bs916、 ΔresD 、 ΔabrB 及 $\Delta\text{resD}\Delta\text{abrB}$ 的产量分别提高 2.9、3.2、3.7、5.0 倍。其中, $\Delta\text{resD}\Delta\text{abrB}$ 菌株的杆菌霉素 L 产量达 1 175.5 mg/L, 为野生型 Bs916 的 20.7 倍。上述结果表明, 贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 衍生菌株在葡萄糖-无机盐培养基中发酵时杆菌霉素 L 产量较 LB 培养基显著提高, 这为推动其规模化生产及产业化应用奠定了基础。

3 讨论与结论

在抗生素耐药性危机背景下, 芽孢杆菌源抗菌肽作为新型抗微生物制剂展现出巨大的替代潜力^[8]。杆菌霉素 L 作为一种天然脂肽类化合物具有优良的抗真菌活性, 是极具潜力的候选抗生素替代物之一^[31]。然而, 其在常规实验室条件下产量较低, 以本研究对象贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 为例, 其产量仅 19.7 mg/L 左右, 这已成为限制其规模化应用的关键瓶颈(表 2)^[27]。因此, 阐明杆菌霉素 L 生物合成的调控机制对于制定产量提升策略(尤其是基于基因工程的策略)至关重要。

已有研究证实, 转录因子是表面活性素、伊枯草素、泛素素等脂肽类物质合成的关键调控因子^[10-11,18,32-33]。AbrB 是芽孢杆菌全局转录调控因子, 参与复杂的调控网络, 调控细菌稳定期功能基因的表达, 包括与抗生素合成相关的基因^[34-35]。本研究发现, AbrB 可负向调控 *Bac* 基因簇的转录水平(图 3), 并降低杆菌霉素 L 的合成量(图 1、表 2), 表明 AbrB 是脂肽类抗生素杆菌霉素 L 合成的负调控因子, 其失活后能显著提高菌株的真菌抑制活性(图 2)。此外, 我们前期研究也表明 AbrB 能够负向调控贝莱斯芽孢杆菌中表面活性素、罗克霉素以及副地衣芽孢杆菌中杆菌肽的转录水平^[21,28,36]。这些结果进一步证实, 作为全局调控因子的 AbrB 对芽孢

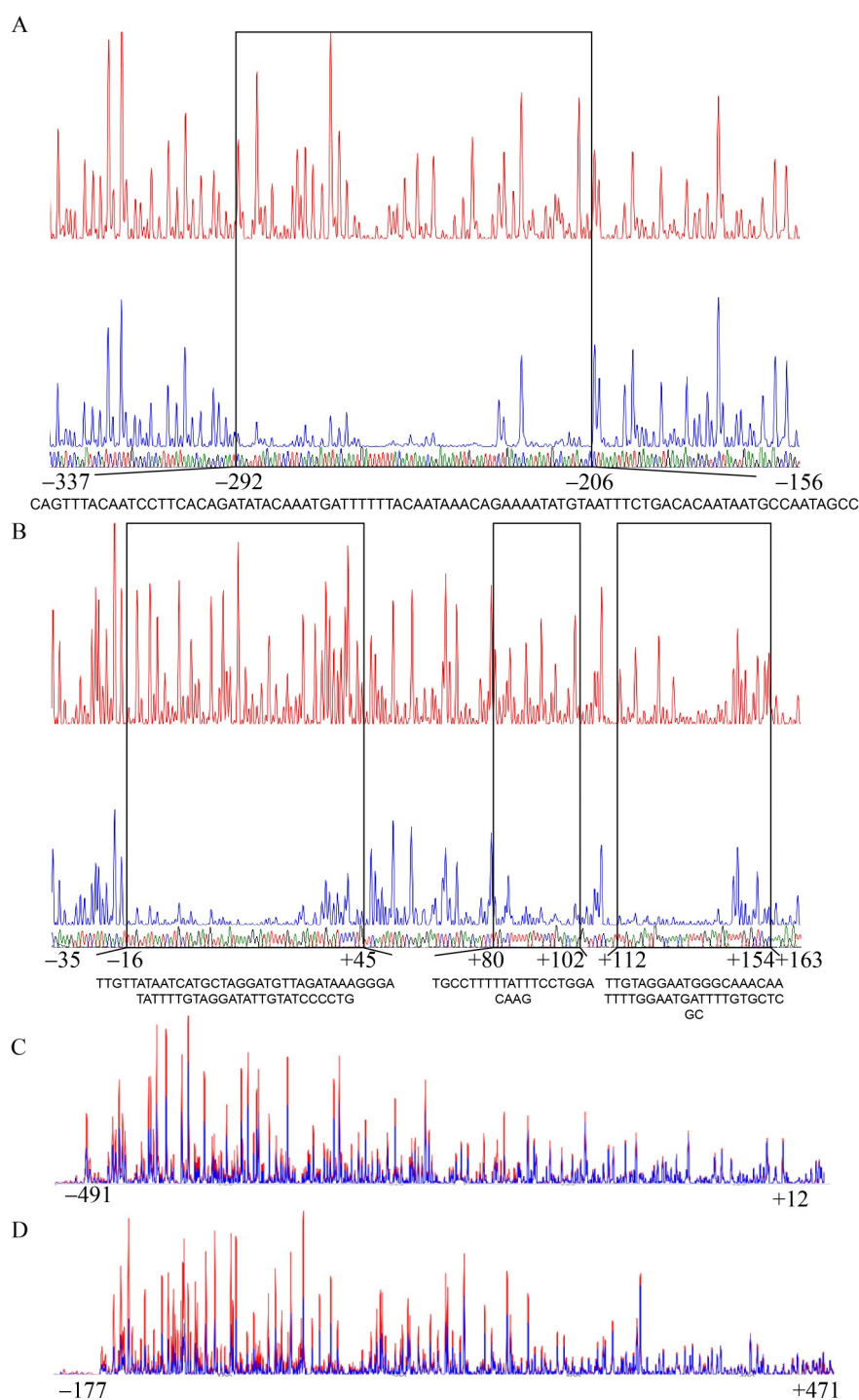


图5 ResD和AbrB与*Bac*基因簇侧翼序列结合位点的分析

Figure 5 Analysis of the binding sites of ResD and AbrB to the flanking sequences of the *Bac* gene cluster. A: Detection of the specific binding sites of probe1 with AbrB; B: Detection of the specific binding sites of probe2 with AbrB; C: Detection of the specific binding sites of probe1 with ResD; D: Detection of the specific binding sites of probe2 with ResD.

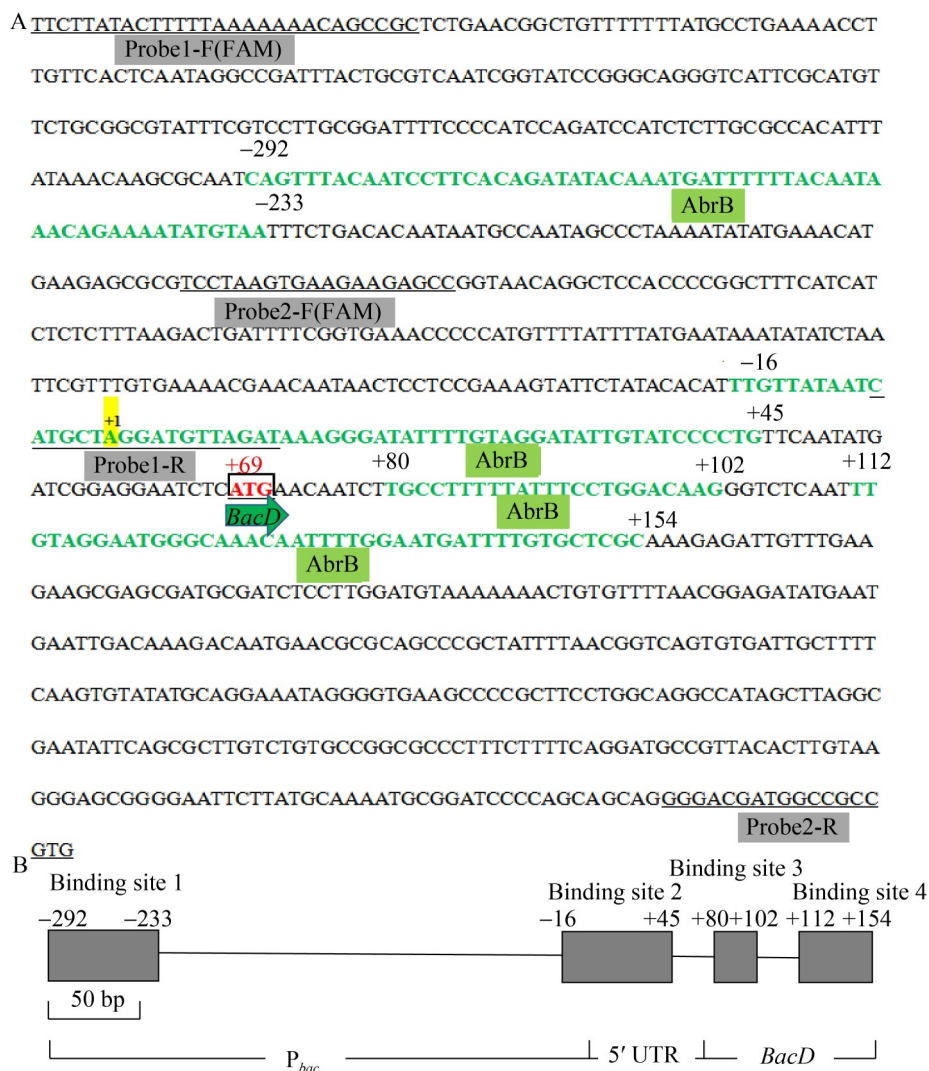


图6 AbrB与*Bac*基因簇侧翼序列结合位点分析

Figure 6 Analysis of AbrB binding sites within the flanking sequences of the *Bac* gene cluster; A: Mapping of AbrB binding sites within the flanking sequences of the *Bac* gene cluster; B: Schematic diagram of AbrB binding sites in the *Bac* gene cluster

杆菌次级代谢网络中的基因具有广泛的调控作用。研究表明, AbrB 具有广泛的 DNA 结合能力, 其靶向 DNA 位点并非单一的共有序列, 这意味着其在结合底物 DNA 时可能表现出相对广泛的靶序列选择性, 而这一特性正是其在芽孢杆菌中作为全局转录调控因子发挥功能的基础^[16,35]。本研究进一步验证了这一结论: AbrB 不仅能直接结合 *Bac* 基因簇的启动子区域(P_{bac}),

还能结合 *BacD* 基因的 5'非翻译区(5' UTR)及编码区(图 5A、5B 和图 6), 表明 AbrB 可从多个层面参与杆菌霉素 L 的转录调控。此外, AbrB 对不同 DNA 片段的亲和力存在差异(图 4C、4D), 这是其区分靶序列能力的另一体现^[16], 但其与 *Bac* 基因簇 4 个 DNA 片段之间的具体结合亲和力仍需进一步研究。同时, AbrB 倾向于结合靶序列中富含 A+T 的区域, 从而削弱 RNA

聚合酶与启动子 DNA 之间的相互作用^[15,17,21,37-38]。

与 AbrB 不同, ResD 是一种与 ResE 协同作用的全局调控因子, 参与调控芽孢杆菌的有氧和无氧呼吸过程^[22,39]。已有研究表明, ResD-ResE 双组分系统可能通过调控 PhoR-PhoP 系统间接影响脂肽合成, 而 PhoR-PhoP 系统已被证实可正向调控表面活性素和泛革素的合成^[12,25]。本研究发现, *resD* 基因失活后 *BacD* 基因的表达量(图 3)和杆菌霉素 L 的产量(图 1、表 2)均显著上调, $\Delta resD$ 的真菌抑制活性较野生型也显著提升(图 2)。这表明, 与 AbrB 类似, ResD 同样是杆菌霉素 L 合成的负调控因子, 推测其可能通过直接结合 P_{bac} 区域抑制 *Bac* 基因簇的转录, EMSA 实验结果也初步支持了这一推测(图 4E、4F)。然而, 令人困惑的是, 覆盖全部启动子区域的 Probe1 和覆盖 5' UTR 及部分编码区(*BacD*)的 Probe2 均表现出与 ResD 较强的结合活性(图 4E、4F), 但经多次尝试仍未能明确其具体结合位点(图 5C、5D)。我们前期在测试 ResD 蛋白与环脂肽罗克霉素转录起始位点侧翼序列中覆盖全部 5' UTR 区域的探针时也观察到类似现象^[21], 推测可能是 5' UTR 序列诱导 DNA 构象发生弯曲或扭结, 导致 ResD 蛋白识别的是这种弯曲的 DNA 构象, 从而使 DNase I 切割模式呈现弥散性保护, 无法鉴定出特异性位点。当然, 这一推测仍需进一步验证。此外, 综合比较 AbrB 与 ResD 在相同靶标 DNA 上结合位点鉴定结果的显著差异, 我们推测与 AbrB 相比, ResD 可能以较低的亲和力或较弱的特异性与 DNA 结合, 导致在 DNase I 切割条件下难以形成稳定的保护区域。后续可通过优化体外结合实验条件以提高目标蛋白与靶标序列的结合活性, 或采用更灵敏的足迹技术[如结合位点分析法(ChIP-seq)]在全基因组范围内鉴定 ResD 的结合位点, 从而揭示其真实的结合模式, 确定是否存在广泛的低亲和力结合或构象依赖型识别。研究表明, AbrB 与双组分调控系统 ResD-ResE 可能通

过 2 条独立的调控通路控制核糖体肽细菌素 subtilosin 的合成^[40], 但二者均在 *sbo-alb* 转录启动层面发挥作用^[33]。AbrB 通过直接结合 *sbo-alb* 启动子的特异性调控区域, 以空间位阻效应阻断 RNA 聚合酶及转录激活因子对该启动子区的结合与访问, 从而直接阻遏 *sbo-alb* 操纵子的转录起始。当细胞接近静止期时, Spo0A 磷酸化水平升高, 抑制 *abrB* 基因的转录^[41], 细菌素合成随之增加。ResD 则在亚硝酸盐积累时被激活, 进入启动子区域与 RNA 聚合酶相互作用以促进转录起始。然而, 关于二者对脂肽类抗生素的共同调控鲜有报道。本研究发现, 同时敲除这 2 个基因后非核糖体肽杆菌霉素 L 的产量可进一步提高 12.0 倍, 达到 235.1 mg/L (图 1A、表 2), 显著高于已报道的野生型菌株产量 (19.7 mg/L)^[27]。同样地, 在贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 中, 与杆菌霉素 L 共同生产的另一种非核糖体肽罗克霉素也表现出类似的 AbrB 与 ResD 叠加产量调控效应, 但二者在时空上的调控关系仍需进一步验证^[21]。

发酵工艺优化与菌株基因工程改造均是实现芽孢杆菌源抗菌肽规模化生产的有效策略, 二者叠加应用更有助于突破低产量瓶颈^[8]。贝莱斯芽孢杆菌 Bs916 基因工程菌株 $\Delta resD\Delta abrB$ 在优化的葡萄糖-无机盐培养基发酵罐条件下, 杆菌霉素 L 每升产量能达到克级别(表 2)。综上所述, 基因工程改造与发酵工艺优化双策略的叠加运用可有效推动以杆菌霉素 L、表面活性素等为代表的芽孢杆菌源非核糖体肽的规模化生产及产业化应用^[28], 更为其他微生物次级代谢产物高产菌株的构建和量产实践提供了重要借鉴。

作者贡献声明

王小花: 提出概念、数据分析、撰写文章; 沈瀚文: 审阅; 蔡莎丽: 实验设计和方案优化; 刘雯倩: 软件程序; 刘雪辉: 提供资源; 周长勇: 保藏菌株; 尹秀莲: 监督管理; 苏可鑫: 协助实验操作; 罗楚

平：获取基金、监督指导、项目管理。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Romano A, Vitullo D, di Pietro A, Lima G, Lanzotti V. Antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO7[J]. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(2): 145-151.
- [2] Gao L, Han JZ, Liu HX, Qu XX, Lu ZX, Bie XM. Plipastatin and surfactin coproduction by *Bacillus subtilis* PB2-L and their effects on microorganisms[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2017, 110(8): 1007-1018.
- [3] Théatre A, Hoste ACR, Rigolet A, Benneceur I, Bechet M, Ongena M, Deleu M, Jacques P. *Bacillus* sp. a remarkable source of bioactive lipopeptides[M]// *Biosurfactants for the Biobased Economy*. ChamSpringer International Publishing, 2021: 123-179.
- [4] Wang ZM, Liu C, Shi YY, Huang MM, Song ZY, Simalgandara J, Li NY, Shi JY. Classification, application, multifarious activities and production improvement of lipopeptides produced by *Bacillus*[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 64(21): 7451-7464.
- [5] 罗楚平. 枯草芽胞杆菌Bs916产罗克霉素、表面活性素、杆菌霉素和泛革素的结构鉴定、合成途径及生物学功能[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
Luo CP. Structure elucidation, biosynthetic pathway and biological function of the locillomycin, surfactin, bacillomycin and fengycin produced by the *Bacillus subtilis* BS916[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [6] Zhang B, Dong CJ, Shang QM, Han YZ, Li PL. New insights into membrane-active action in plasma membrane of fungal hyphae by the lipopeptide antibiotic bacillomycin L[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2013, 1828(9): 2230-2237.
- [7] Hu JL, Zheng MZ, Dang SZ, Shi M, Zhang JL, Li YZ. Biocontrol potential of *Bacillus amyloliquefaciens* LYZ69 against anthracnose of alfalfa (*Medicago sativa*)[J]. *Phytopathology*, 2021, 111(8): 1338-1348.
- [8] Puan SL, Erriah P, Baharudin MMA, Yahaya NM, Ahmad Kamil WNIW, Ali MSM, Ahmad SA, Oslan SN, Lim S, Sabri S. Antimicrobial peptides from *Bacillus* spp. and strategies to enhance their yield[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(18): 5569-5593.
- [9] Qian SQ, Lu HD, Meng PP, Zhang C, Lv FX, Bie XM, Lu ZX. Effect of inulin on efficient production and regulatory biosynthesis of bacillomycin D in *Bacillus subtilis* fmbJ[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 179: 260-267.
- [10] Sun J, Liu Y, Lin F, Lu Z, Lu Y. *CodY*, *ComA*, *DegU* and *Spo0A* controlling lipopeptides biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* fmbJ[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(3): 1289-1304.
- [11] Hu SY, He PH, Zhang YJ, Jiang M, Wang Q, Yang SH, Chen SW. Transcription factor DegU-mediated multi-pathway regulation on lichenysin biosynthesis in *Bacillus licheniformis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 74: 108-120.
- [12] Salzberg LI, Botella E, Hokamp K, Antelmann H, Maaß S, Becher D, Noone D, Devine KM. Genome-wide analysis of phosphorylated PhoP binding to chromosomal DNA reveals several novel features of the PhoPR-mediated phosphate limitation response in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(8): 1492-1506.
- [13] Olson AL, Tucker AT, Bobay BG, Soderblom EJ, Moseley MA, Thompson RJ, Cavanagh J. Structure and DNA-binding traits of the transition state regulator AbrB[J]. *Structure*, 2014, 22(11): 1650-1656.
- [14] Neubauer S, Borriß R, Makarewicz O. Thermodynamic and molecular analysis of the AbrB-binding sites within the phyC-region of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2012, 287(2): 111-122.
- [15] Chumsakul O, Takahashi H, Oshima T, Hishimoto T, Kanaya S, Ogasawara N, Ishikawa S. Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(2): 414-428.
- [16] Bobay BG, Benson L, Naylor S, Feeney B, Clark AC, Goshe MB, Strauch MA, Thompson R, Cavanagh J. Evaluation of the DNA binding tendencies of the transition state regulator AbrB[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(51): 16106-16118.
- [17] Shen XX, Yu QY, Liu HH, Wang JJ, Zhang RB, Peng Q, Song FP. Transition phase regulator AbrB positively regulates the *sip1Abl* gene expression in *Bacillus thuringiensis*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9: e00075-21.
- [18] Qi XH, Liu W, He X, Du CM. A review on surfactin: molecular regulation of biosynthesis[J]. *Archives of Microbiology*, 2023, 205(9): 313.
- [19] Yang RR, Lei SZ, Xu XG, Jin H, Sun H, Zhao XX, Pang B, Shi JL. Key elements and regulation strategies of NRPSs for biosynthesis of lipopeptides by *Bacillus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(19): 8077-8087.
- [20] Xu YX, Cai DB, Zhang H, Gao L, Yang Y, Gao JM, Li YY, Yang CL, Ji ZX, Yu J, Chen SW. Enhanced production of iturin A in *Bacillus amyloliquefaciens* by genetic engineering and medium optimization[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 90: 50-57.
- [21] Wang XH, Shen HW, Zhang P, Ji ZZ, Xu XX, Wan FX, Yin XL, Bai QY, Du LC, Jiang JS, Luo CP. AbrB and ResD negatively regulate locillomycin synthesis in *Bacillus velezensis* Bs916 by binding to the flanking sequences of transcription start sites[J]. *Journal of Biotechnology*, 2026, 410: 207-216.
- [22] Zhang XH, Hulett FM. ResD signal transduction regulator of aerobic respiration in *Bacillus subtilis*: *ctaA* promoter regulation[J]. *Molecular Microbiology*, 2000,

- 37(5): 1208-1219.
- [23] Galperin MY. Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(12): 4169-4182.
- [24] Kenney LJ. Structure/function relationships in OmpR and other winged-helix transcription factors[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(2): 135-141.
- [25] Chen MC, Zheng MX, Chen YP, Xiao RF, Zheng XF, Liu B, Wang JP, Zhu YJ. Effect of metal ions on lipopeptide secretion from *Bacillus subtilis* strain FJAT-4: negative regulation by Ca^{2+} [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(3): 2167-2176.
- [26] Luo CP, Chen YX, Liu XH, Wang XH, Wang XY, Li XQ, Zhao YP, Wei LH. Engineered biosynthesis of cyclic lipopeptide locillomycins in surrogate host *Bacillus velezensis* FZB42 and derivative strains enhance antibacterial activity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(11): 4467-4481.
- [27] Luo CP, Liu XH, Zhou HF, Wang XY, Chen ZY. Nonribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 422-431.
- [28] Luo KC, Chen YW, Qian XY, Zhong HJ, Onchari MM, Liu XH, Tian BX, Zang SS, Yin XL, Chen XX, Zheng HC, Wang XH, Luo CP. Enhancing surfactin production in *B. velezensis* Bs916 combined cumulative mutagenesis and expression key enzymes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(13): 4233-4244.
- [29] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [30] Wang Y, Cen XF, Zhao GP, Wang J. Characterization of a new GlnR binding box in the promoter of *amtB* in *Streptomyces coelicolor* inferred a PhoP/GlnR competitive binding mechanism for transcriptional regulation of *amtB*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(19): 5237-5244.
- [31] Luo CP, Liu JC, Bilal M, Liu XH, Wang XH, Dong F, Liu Y, Zang SS, Yin XL, Yang XT, Zhu T, Zhang SY, Zhang WF, Li B. Extracellular lipopeptide bacillomycin L regulates serial expression of genes for modulating multicellular behavior in *Bacillus velezensis* Bs916[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(18): 6853-6870.
- [32] Yazgan Karata A, Çetin S, Özcengiz G. The effects of insertional mutations in *comQ*, *comP*, *srfA*, *spo0H*, *spo0A* and *abrB* genes on bacilysin biosynthesis in *Bacillus subtilis*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2003, 1626(1/2/3): 51-56.
- [33] Rahman MS, Ano T, Shoda M. Second stage production of iturin A by induced germination of *Bacillus subtilis* RB14[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 125(4): 513-515.
- [34] Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(1): 141-172.
- [35] Kobir A, Poncet S, Bidnenko V, Delumeau O, Jers C, Zouhir S, Grenha R, Nessler S, Noirot P, Mijakovic I. Phosphorylation of *Bacillus subtilis* gene regulator AbrB modulates its DNA-binding properties[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 92(5): 1129-1141.
- [36] Luo CP, Chen ML, Luo KC, Yin XL, Onchari MM, Wang XH, Zhang JF, Zhong HJ, Tian BX. Genome sequencing and genetic engineering reveal the contribution of bacitracin produced by *Bacillus paralicheniformis* CPL618 to anti-*Staphylococcus aureus* activity[J]. *Current Microbiology*, 2023, 80(5): 135.
- [37] Robertson JB, Gocht M, Marahiel MA, Zuber P. AbrB, a regulator of gene expression in *Bacillus*, interacts with the transcription initiation regions of a sporulation gene and an antibiotic biosynthesis gene[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(21): 8457-8461.
- [38] Chumsakul O, Nakamura K, Kurata T, Sakamoto T, Hobman JL, Ogasawara N, Oshima T, Ishikawa S. High-resolution mapping of *in vivo* genomic transcription factor binding sites using *in situ* DNase I footprinting and ChIP-seq[J]. *DNA Research*, 2013, 20(4): 325-338.
- [39] Geng H, Zuber P, Nakano MM. Regulation of respiratory genes by ResD-ResE signal transduction system in *Bacillus subtilis*[M]//Two-Component Signaling Systems, Part A. Amsterdam: Elsevier, 2007: 448-464.
- [40] Nakano MM, Zheng GL, Zuber P. Dual control of *sbo-alb* operon expression by the Spo0 and ResDE systems of signal transduction under anaerobic conditions in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(11): 3274-3277.
- [41] Fagerlund A, Dubois T, Økstad OA, Verplaetse E, Gilois N, Bennaceur I, Perchat S, Gominet M, Aymerich S, Kolstø AB, Lereclus D, Gohar M. SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87532.